

学校编码: 10384
学 号: 200426044

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

连续流生物制氢反应系统的启动及产氢微生物的强化

Study on Start-up and Bioaugmentation of Continuous
Biohydrogen Production System

史继祥

指导教师姓名: 龙 敏 南 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2007 年 4 月 29 日

论文答辩时间: 2007 年 6 月 4 日

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 宋思扬 教授

评 阅 人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密 (), 在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密 ()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名: 日期: 年 月 日

导师签名: 日期: 年 月 日

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
1 前言	1
1.1 生物制氢	1
1.1.1 光生物制氢	1
1.1.2 生物质发酵制氢	3
1.2 生物质发酵制氢反应器	4
1.2.1 生物制氢反应器的设计	4
1.2.2 接种污泥与反应器启动	6
1.2.3 污泥预处理与反应器启动	6
1.2.4 生态因子与反应器启动	8
1.2.5 反应器的定向启动	10
1.3 生物强化技术	13
1.3.1 生物强化技术在废水处理中的应用	13
1.3.2 生物强化技术在其他领域的应用	16
1.4 本研究的目的是和内容	17
2 材料与方法	18
2.1 实验材料	18
2.1.1 接种污泥及产氢菌种的来源	18
2.1.2 实验原料	18
2.1.3 主要仪器	18
2.2 实验装置	19
2.3 实验方法	21
2.3.1 总糖测定方法（3,5-二硝基水杨酸比色法）	21
2.3.2 COD 测定方法（重铬酸钾法）	22
2.3.3 挥发性悬浮物（VSS）测定方法	23

2.3.4 氢气含量测定.....	23
2.3.5 有机酸含量的测定.....	24
2.3.6 乙醇含量的测定.....	25
2.3.7 高效产氢菌种培养方法.....	26
2.3.8 产氢细菌生物量测定.....	26
2.3.9 光学显微镜观察.....	26
3 结果与分析	27
3.1 反应器启动相关参数的选取	27
3.1.1 接种污泥.....	27
3.1.2 启动负荷和目标负荷.....	28
3.1.3 水力停留时间.....	28
3.1.4 pH 值.....	29
3.2 有机负荷对反应器启动的影响	30
3.2.1 液相末端发酵产物变化规律.....	30
3.2.2 产氢产气速率的变化规律.....	31
3.2.3 pH 值和生物量变化规律.....	36
3.3 水力停留时间对反应器启动的影响	38
3.3.1 液相末端发酵产物变化规律.....	38
3.3.2 产氢产气速率的变化规律.....	40
3.3.3 pH 值的变化规律.....	42
3.4 pH 值对反应器启动的影响	42
3.4.1 液相末端发酵产物变化规律.....	43
3.4.2 产氢产气速率的变化规律.....	45
3.5 生物强化处理对反应器启动的影响	47
3.5.1 高效产氢菌种的选用及特性.....	47
3.5.2 生物制氢反应器生物强化技术主要控制参数选取.....	47
3.5.2.1 高效产氢菌投加方式的选择.....	47
3.5.2.2 高效产氢菌投加剂量的选择.....	49
3.5.2.3 高效产氢菌投加时期的选择.....	49

3.5.3 反应器在生物强化处理的前后变化.....	49
3.5.3.1 液相末端发酵产物变化.....	49
3.5.3.2 产氢速率变化.....	51
4 结论与讨论	52
4.1 UASB 生物制氢反应器启动对策.....	52
4.2 生物强化作用在反应器产氢方面的效果	53
4.3 UASB 生物制氢反应系统未来研究方向.....	53
4.4 工业化生物制氢反应系统研究展望	54
参考文献	55
致 谢.....	61

Catalogue

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	II
1 Introduction	1
1.1 Biohydrogen production	1
1.1.1 Photosynthetic biohydrogen production	1
1.1.2 Fermentative biohydrogen production from biomass	3
1.2 Fermentative biohydrogen production reactor using biomass	4
1.2.1 Design of biohydrogen production reactor	4
1.2.2 Effects of seeding sludge on reactor start-up	6
1.2.3 Effects of sludge pretreatment on reactor start-up	6
1.2.4 Effects of ecological factors on reactor start-up	8
1.2.5 Directional start-up of reactor	10
1.3 Bioaugmentation	13
1.3.1 Application of bioaugmentation in waste water treatment	13
1.3.2 Application of bioaugmentation in other fields	16
1.4 Purpose and content of the research	17
2 Materials and methods	18
2.1 Materials of experiments	18
2.1.1 Source of seeding sludge and hydrogen production strain	18
2.1.2 Experimental substrate	18
2.1.3 Main instruments	18
2.2 Equipment of experiments	18
2.3 Methods of experiments	21
2.3.1 Method for determination of total sugar	21
2.3.2 Method for determination of COD	22
2.3.3 Method for determination of volatile suspended substance.....	23

2.3.4 Determination of hydrogen content	23
2.3.5 Determination of organic acid content.....	24
2.3.6 Ethanol content determination	25
2.3.7 Cultivation of high hydrogen production bacteria	26
2.3.8 Biomass determination of hydrogen production bacteria	26
2.3.9 Routine optics microscope	26
3 Results and analysis	27
3.1 Factors selection of reactor start-up.....	27
3.1.1 Seeding sludge	27
3.1.2 Start-up OLR and target OLR.....	28
3.1.3 Hydraulic retention time	28
3.1.4 pH value	29
3.2 Effect of OLR on reactor start-up	30
3.2.1 Fermentation products	30
3.2.2 Hydrogen and biogas producing rate	31
3.2.3 pH value and biomass	36
3.3 Effect of HRT on reactor start-up	38
3.3.1 Fermentation products	38
3.3.2 Hydrogen and biogas producing rate	40
3.3.3 pH value	42
3.4 Effect of pH value on reactor start-up	42
3.4.1 Fermentation products	43
3.4.2 Hydrogen and biogas producing rate	45
3.5 Effect of bioaugmentation on reactor start-up.....	47
3.5.1 Selection and character of high hydrogen producing bacteria.....	47
3.5.2 Factors of bioaugmentation affecting reactor start-up	47
3.5.2.1 Inoculation methods of efficient hydrogen producing bacteria	47
3.5.2.2 Inoculation quantity of efficient hydrogen producing bacteria.....	49
3.5.2.3 Selection of dosing period	49

3.5.3 Change of reactor after bioaugmentation.....	49
3.5.3.1 Change of fermentation products.....	49
3.5.3.2 Change of hydrogen producing rate.....	51
4 Conclusion and discussion	52
4.1 Start-up strategy UASB biohydrogen production reactor	52
4.2 Effect of bioaugmentation on hydrogen production	53
4.3 Research direction of UASB reactor in the future	53
4.4 Research prospect of biohydrogen production industrialization	54
References	55
Acknowledgements	61

摘要

氢气因具有洁净无污染、燃烧热值高、易于储存和运输等优点而被公认为未来的理想燃料。本研究以混合菌种连续流生物制氢反应器的启动为基础，对反应器启动时的生态因子以及对丁酸型发酵的投菌强化作用进行了研究，提出建立目标发酵类型发酵产氢菌群，实现连续流生物制氢反应器快速启动的人工调控。

本研究采用上流式厌氧污泥床（UASB），以厦门市污水处理厂的活性污泥作为菌种，人工配制的糖蜜废水作为底物，考察有机负荷、水力停留时间和 pH 值对 UASB 生物制氢反应器启动的影响，并利用生物强化技术，在反应器启动期间向反应器间歇投加高产氢菌产酸克雷伯氏菌（*Klebsiella oxytoca*）HP1，考察强化处理后反应器的产氢效能。

研究表明，启动负荷对 UASB 反应器发酵类型的形成有重要影响，当启动负荷为 $6.0 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ 时，反应器呈乙醇型发酵。控制 HRT 为 9 h 时，可增加反应器内产氢发酵菌群对底物的利用率，提高反应器的产氢能力。当反应器进水 pH 值控制在 5.5 ± 0.1 时，反应器可获得最大产氢速率 $3.94 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

对 UASB 反应器采用间歇方式投加高效产氢微生物产酸克雷伯氏菌 HP1，投菌量为接种污泥量的 3%，连续投加 10 d。投菌强化启动的效果表明，反应器经投菌强化作用后，启动时间提前了 5 d，产氢速率比正常启动时要高 25%，乙酸和丁酸的总量比正常启动高 10%。投菌强化作用不仅能改善系统的微生物群落结构，提高反应器运行的稳定性，而且可缩短反应器启动所需时间，有利于反应器的快速启动。

关键词：生物制氢；反应器启动；生物强化

Abstract

Hydrogen is expected to become an ideal fuel in the future because it is clean, pollution-free. As a high energy carrier, hydrogen can be stored and transported easily. Based on the continuous flow test of mixed microflora, this research involved start-up of biohydrogen production reactor and the enhancement start-up of butyrate type fermentation. The start-up strategy of UASB biohydrogen production reactor was put forward, which would establish high efficient hydrogen producing population in a short time.

An up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor was used for biohydrogen production. The seed sludge was taken from Xiamen sewage processing plant. Molasses was used as substrate. Emphasis was placed on assessing the factors affecting the UASB reactor start-up process, which includes organic loading rate (OLR), hydraulic retention time (HRT) and pH value. The bioaugmentation technology was introduced into the UASB biohydrogen production reactor. During the start-up process, *Klebsiella oxytoca* HP1 was put in the reactor intermittently and the hydrogen production capacity was investigated.

The results of the effect of the initial OLR on the UASB reactor suggests that ethanol type fermentation was established when the initial OLR was controlled at $6.0 \text{ kgCOD} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. The rate of conversion of molasses was increased by the hydrogen producing microbial community at HRT of 9 h and the hydrogen production capacity of the UASB reactor increased evidently. When pH value was controlled at about 5.5 ± 0.1 , the maximal hydrogen production rate was obtained as $3.94 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$.

High efficient hydrogen producing bacteria *Klebsiella oxytoca* HP1 was used to enhance the UASB reactor start-up process for ten days and its inoculation was 3% of total seeding sludge. The results demonstrated that, the hydrogen production rate of the reactor with bacteria dosing was 25 % higher than that without augmentation. Acetate and butyrate were the main volatile fatty acids (VFA) products and their content was 10% higher than that without augmentation. Compared with the normal

start-up process, the start-up time of the reactor with dosing bacteria cells shorted 5 days. Bacteria dosing during reactor start-up not only improved microbial community structure and increased operational stability but also shortened start-up time. Bacteria dosing was a good way for reactor start-up.

Keywords: biohydrogen production; reactor start-up; bioaugmentation

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

能源对人类的生存和社会的发展至关重要。随着经济和社会的发展,人们对能源的需求将日益增大。煤和石油等化石燃料作为初级能源,一方面面临着资源枯竭的问题,另一方面在其利用过程中还会引起温室效应、环境污染等,所以世界各国更加重视清洁能源——氢能的发展。1977年,联合国国际能源局组织了由多个发达国家参与的“氢能执行合约”,将氢能的研究推向国际化,希望能开创氢能经济新时代;美国也分别在1990年、1996年和2003年通过了关于氢能研究的法规,日本和欧盟也启动了相关项目加强氢能的研究^[1]。

氢能作为“二次能源”,具有高效、清洁等优点,其燃烧值为122kJ/g,为汽油的2.75倍;燃烧产物是水而不是温室气体;能直接通过燃料电池转化为电能^[2]。目前,国际上的制氢方法主要有电解制氢、热解制氢、光化制氢、放射能水解制氢、等离子电化学法制氢、矿石燃料制氢和生物制氢等^[3,4]。其中,生物制氢在生成过程中具有清洁、节能、且不消耗矿物资源和成本低等突出优点,符合可持续发展战略的需求,所以它将成为未来能源制备技术的主要发展方向之一。

生物制氢的想法最早是在20世纪60年代提出。根据微生物的生理代谢特性,能够产生分子氢的微生物可以分为两大主要类群:(1)包括藻类和光合细菌在内的光合生物;(2)诸如兼性厌氧和专性厌氧的发酵产氢细菌。由于产氢的微生物划分为光合细菌和发酵细菌两大类群,所以目前生物制氢也发展为两个主要研究方向,即光合法生物制氢和发酵法生物制氢。

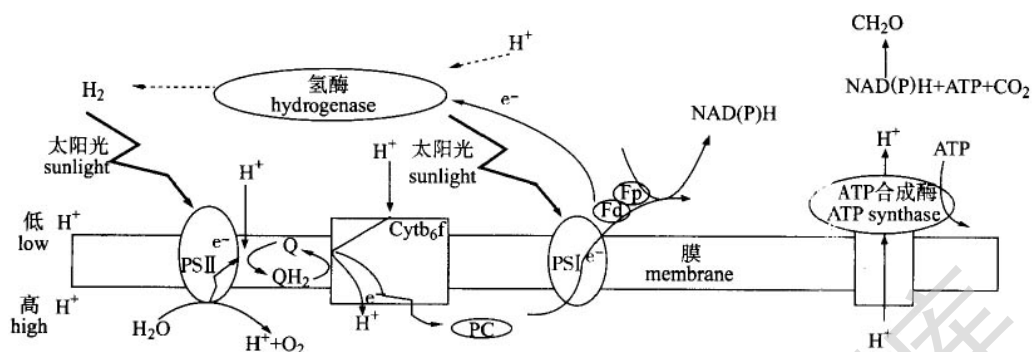
1.1 生物制氢

1.1.1 光生物制氢

自1942年Gaffron和Rubin^[5]发现一种栅列藻属绿藻(*Scenedesmas* sp.)产氢以来,研究者发现进行光合作用产氢的微生物可以分为两大类:藻类和光合细菌(PSB)。

藻类在厌氧条件下,通过光合作用分解水产生氢气和氧气,其作用机理和绿色植物光合作用机理相似,光合作用路线如图1-1所示。这一光合系统具有两个独立但协调起作用的光合作用中心:接收太阳能分解水产生 H^+ 、电子和 O_2 的光合系统II(PS II)和产生还原剂用来固定 CO_2 的光合系统I(PS I)。PS II产生的电子由铁氧化还原蛋白携带经由PS II和PS I到达产氢酶, H^+ 在产氢酶的催化作用

下在一定条件形成 H_2 ^[6]。

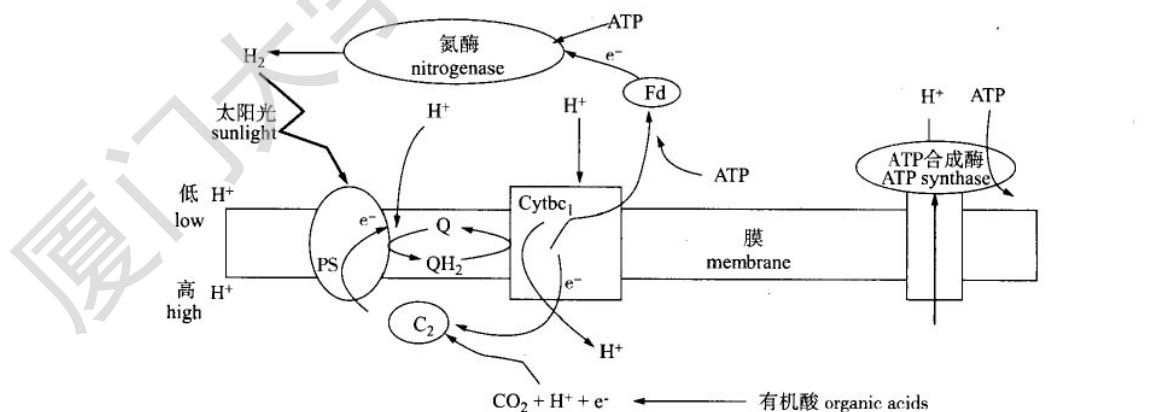


P680: PS II阶段的反应中心 PS II reaction center; P700: PS I阶段的反应中心 PS I reaction center; Q: PS II阶段的主要电子受体 PS II main electron receptor; Cytb₆f: 细胞色素 b₆f cytochrome; PC: 质体蓝素 plastocyanin; Fd: 铁氧还原蛋白 ferredoxins; Red: NAD (P) H氧化还原酶 oxido-reductase, 氢酶 hydrogenase

图 1-1 藻类光合产氢过程电子传递示意图

Fig.1-1 Electron transfer diagram of photobiological production of hydrogen by algae

光合细菌产氢也是太阳能驱动下光合作用的结果,但是光合细菌只有一个光合作用中心,相当于藻类的光合系统 I。由于缺少藻类中起光解水作用的光合系统 II,所以只进行以有机物作为电子供体的不产氧光合作用,光合细菌光合作用及电子传递的主要过程如图 1-2 所示。光合细菌所固有的只有一个光合作用中心的特殊简单结构,决定了它所固有的相对较高的转化效率,具有提高光转化效率的巨大潜力。



PS: 光合反应中心 Photosynthetic reaction center; Q: PS II阶段的主要电子受体 PS II main electron receptor; Cytbc₁: 细胞色素 bc₁ cytochrome; Fd: 铁氧还原蛋白 ferredoxins; C₂: 电子受体 electron receptor

图 1-2 光合细菌光合产氢过程电子传递示意图

Fig.1-2 Electron transfer diagram of photobiological production of hydrogen by photosynthetic bacterium

关于藻类和光合细菌的产氢研究很多, Miyake 等^[7]采用类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)8703 以乳酸为底物得到了非常高的产氢效率 10.4 mmol/g dw·h; Sasikala 等^[8]用海藻酸钙固定类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)以酿酒废水为底物进行连续培养方式光合制氢,得到 3094 mL H₂/L-废水的转化率; Kumar 等^[9]对几株蓝细菌进行产氢比较研究,发现在间歇培养时鱼腥蓝细菌属 (*Anabaena* sp.)CA 的产氢速率较高,为 1.4 mmol/g dw·h; 荚膜红细菌^[10](*Rhodobacter capsulatus*)氢酶缺失型突变体 ST410 产氢比野生型产氢有大幅提高。

目前,光生物制氢研究主要有光合产氢机理的研究、参与产氢过程的酶结构和功能研究、产氢抑制因素的研究、产氢电子供体的研究、高效产氢基因工程菌研究和实用系统的开发研究等。在这些发展方向中,高效产氢基因工程菌的构建以及光合反应器等开发具有较大的研究价值。60 多年来,人们对光合法生物制氢技术开展了大量的研究工作,但是效果并不理想。光合细菌的产氢能力及其对光能的转化效率都偏低^[11],产氢代谢过程的稳定性差,而且光合法制取氢气需要充足的光源,这些问题都限制了光合法生物制氢技术的发展。因此光合法生物制氢技术要达到大规模的工业化生产水平还要解决很多问题。

1.1.2 生物质发酵制氢

发酵法生物制氢的研究始于 90 年代中,随着对其不断深入研究,逐步意识到发酵制氢具有在近期内实现产业化的潜力,所以在暗发酵制氢方面的科研投入也大大增加。

发酵生物制氢主要是利用产氢发酵细菌,根据其自身的生理代谢特性,通过发酵作用,在逐步分解有机底物的过程中产生分子氢。多年来的研究发现,产氢菌种主要包括肠杆菌属(*Enterobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、埃希氏肠杆菌属(*Escherichia*)和杆菌属(*Bacillus*)这四类。其中尤以肠杆菌属和梭菌属研究得最多。发酵型细菌能够利用多种底物在固氮酶或氢化酶的作用下制取氢气,这些底物包括:甲酸、乳酸、丙酮酸、短链脂肪酸、葡萄糖、淀粉、纤维素二糖和硫化物等。表 1-1 列出了部分发酵产氢细菌及其产氢能力。

表 1-1 发酵产氢细菌及其产氢能力

Tab. 1-1 Hydrogen production ability of fermentive bacteria

细菌种属及编号	碳源	产氢能力(molH ₂ /mol 底物)	文献
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	葡萄糖	2.3	[12]
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> P4	葡萄糖	2.76	[13]
<i>Enterobacter aerogenes</i> E.82005	糖蜜	1.58	[14]
<i>Citrobacter</i> sp.Y19	葡萄糖	2.49	[15]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	葡萄糖	1.17	[16]
<i>Clostridium butyricum</i> IFO13949	葡萄糖	1.9	[17]

与光合法生物制氢相比较，发酵法生物制氢具有一定的优越性：(1)发酵法生物制氢的产氢稳定性好。由于发酵法生物制氢利用有机底物的分解制取氢气，它不需要光源，能够不分昼夜地持续产氢，从而保证产生氢气的持续稳定性。(2)发酵产氢细菌的产氢能力较高。大多数光合细菌的产氢能力都在 5 mmolH₂/g dw·h 以下，而发酵细菌大都具有较高的产氢能力，如产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* E.82005 产氢能力为 17mmolH₂/g dw·h^[18]。(3)发酵细菌的生长速率快。研究表明，发酵细菌的生长速率快于光合细菌，它可以为工业化规模的生物制氢快速地提供大量的微生物。(4)制氢成本低。发酵细菌利用的产氢底物是植物光合作用的产物，实际上是对太阳能的间接利用，而且它可以利用工农业生产的废弃物作为原料，实现废物的资源化处理，从而降低发酵法制氢的生产成本。发酵法生物制氢技术的优越性已逐渐被人们所认识。近年来，发酵法生物制氢技术研究受到普遍的关注，正在成为生物制氢研究的热点。

1.2 生物质发酵制氢反应器

1.2.1 生物制氢反应器的设计

生物制氢技术包括光合法和厌氧发酵法两种路线，但由于前者利用光合细菌将太阳能转化为氢能，其光能利用效率较低，而且光反应器设计困难，所以近期内难于推广应用；而后者是利用产氢菌的厌氧发酵，其底物转化率高，产氢速率快，反应器设计简单，且能够利用可再生资源 and 废弃有机物进行生产，相对于前者更容易在短期实现应用化。目前国际上对生物制氢技术的研究仍处于实验室研

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库